

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

WEST

Generate Collection

Print

L44: Entry 21 of 43

File: DWPI

Jul 5, 1999

DERWENT-ACC-NO: 1992-288938

DERWENT-WEEK: 199932

COPYRIGHT 2002 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Stabilisation of CPB-1 for drug compsn. - contains saccharide selected from glucose, glucosamine, xylose, saccharose and/or dextran

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

CODE

KAGAKU OYOBI KESSEI RYOHO

KAGA

KOWA CO LTDI KESSEI RYOHO

KOWA

PRIORITY-DATA: 1990JP-0328287 (November 28, 1990)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 2916948 B2	July 5, 1999		006	C07K014/47
JP 04198196 A	July 17, 1992		004	C07K013/00

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	DESCRIPTOR
JP 2916948B2	November 28, 1990	1990JP-0328287	
JP 2916948B2		JP 4198196	Previous Publ.
JP04198196A	November 28, 1990	1990JP-0328287	

INT-CL (IPC): A61K 37/02; A61K 38/00; A61K 47/26; A61K 47/36; C07K 3/00; C07K 13/00; C07K 14/47

ABSTRACTED-PUB-NO: JP04198196A

BASIC-ABSTRACT:

The stabilisation of CPB-1 (I) or recombinant (I), a saccharide is added to (I) or recombinant (I). A drug compsn. contains (I) or recombinant (I) and a saccharide in which (I) or recombinant (I) is stabilised. the saccharide is pref. at least one selected from glucose (II), glucosamine, xylose, sacchrose and dextran.

USE/ADVANTAGE - The activity of (I) can be kept after (I) is treated by various processes (I) is useful as a treating medicine for antihaemagglutination and dermal and corneal diseases.

In an example, 5mg/ml (II) is added to 6.76 mg/ml (I) dissolved in 10mM phosphate buffer (pH 7.4) and 100 micro-l of the soln. is frozen at -40 deg. C and molten at room temp. The procedure is repeated 6 times and the soln. is analysed. 20 micro-l of the soln. is diluted by the same buffer as above to 1mg/ml and fed to a TSK Gel G3000SMXL column (HPLC gel filtration) to separate (I) from the polymer and the absorbance at 280nm is measured to determine the purity of (I) and the ratio of the polymer. The purity of (I) is 99.6%. The ratio of the polymer is 0.4%. The antihaemagglutination activity (I) contg. 10 mg/ml (II) is 99.7%, compared to 100% for the contragg

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS: STABILISED DRUG COMPOSITION CONTAIN SACCHARIDE SELECT GLUCOSE
GLUCOSAMINE XYLOSE SACCHAROSE DEXTRAN

DERWENT-CLASS: B04 D16

CPI-CODES: B04-B04A6; B04-C02C; B07-A02; B10-A07; B12-A07; B12-H02; B12-L04;
D05-C08; D05-H03B;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 *01*

Fragmentation Code

F012 F014 F423 F521 G010 G013 G100 H1 H100 H101
H181 H182 H4 H401 H441 H481 H5 H598 H8 H9
J0 J011 J012 J1 J111 J171 J172 J3 J371 K0
L2 L250 M210 M211 M271 M280 M281 M311 M312 M313
M314 M315 M320 M321 M331 M332 M333 M340 M342 M343
M349 M371 M381 M391 M423 M431 M510 M520 M521 M530
M531 M540 M541 M620 M782 M903 Q233 V902 V917 V921

Chemical Indexing M1 *06*

Fragmentation Code

M423 M431 M782 M903 M904 M910 Q620 V0 V721
Specific Compounds
01857M

Chemical Indexing M2 *02*

Fragmentation Code

H4 H405 H484 H8 J4 J471 K0 L8 L814 L821
L831 M280 M315 M321 M332 M344 M349 M381 M391 M416
M431 M620 M782 M903 M904 M910 Q620
Specific Compounds
00038M

Chemical Indexing M2 *03*

Fragmentation Code

H1 H100 H181 H4 H404 H484 H8 J4 J471 K0
L8 L814 L821 L834 M280 M315 M321 M332 M344 M349
M381 M391 M416 M431 M620 M782 M903 M904 M910 Q620
Specific Compounds
01615M

Chemical Indexing M2 *04*

Fragmentation Code

H4 H404 H484 H8 J4 J471 K0 L8 L818 L821
L831 M280 M314 M321 M332 M344 M349 M381 M391 M416
M431 M620 M782 M903 M904 M910 Q620
Specific Compounds
00173M

Chemical Indexing M2 *05*

Fragmentation Code

F012 F013 F014 F015 F016 F017 F019 F113 F123 H4
H405 H424 H483 H5 H521 H8 K0 L8 L814 L818
L822 L831 M1 M126 M141 M280 M311 M323 M342 M373
M393 M413 M431 M510 M522 M530 M540 M782 M903 M904
M910 Q620
Specific Compounds
00135M

UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS: 0038U; 0135U; 0173U; 1615U; 1857U

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1992-128518

⑫ 公開特許公報(A) 平4-198196

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)7月17日

C 07 K 13/00

A 61 K 37/02

47/26

47/36

C 07 K 3/00

J
J

7731-4H

8317-4C

7624-4C

7624-4C

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全4頁)

⑭ 発明の名称 CPB-I の安定化方法及びこの製剤組成物

⑮ 特 願 平2-328287

⑯ 出 願 平2(1990)11月28日

⑰ 発 明 者 吉 崎 栄 男 埼玉県狭山市狭山台1-4-9

⑰ 発 明 者 溝 口 俊 美 埼玉県入間市下藤沢1314-3

⑰ 発 明 者 溝 上 寛 熊本県菊池郡合志町幾久富1647-151

⑰ 発 明 者 足 達 聡 熊本県菊池郡菊陽町津久礼字新山3190-202

⑰ 出 願 人 興 和 株 式 会 社 愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号

⑰ 出 願 人 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市清水町大窪668番地

⑰ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

CPB-I の安定化方法及びこの製剤組成物

2. 特許請求の範囲

1. CPB-I 又はリコンビナントCPB-I に、糖類を添加することを特徴とするCPB-I 又はリコンビナントCPB-I の安定化方法。

2. CPB-I 又はリコンビナントCPB-I 及び糖類を含有することを特徴とするCPB-I 又はリコンビナントCPB-I が安定化された製剤組成物。

3. 糖類がグルコース、グルコサミン、キシロース、サッカロース及びデキストランから選ばれた一種又は二種以上である請求項1記載の安定化方法。

4. 糖類がグルコース、グルコサミン、キシロース、サッカロース及びデキストランから選ばれた一種又は二種以上である請求項2記載の製剤組成物。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は抗血液凝固剤、皮膚・角膜疾患治療剤として有用なCPB-I 又はリコンビナントCPB-I の安定化方法及び製剤組成物に関し、詳細には、これらの分離精製、凍結乾燥等の操作を行う際に有用な安定化方法及び保存安全性に優れた製剤組成物に関する。

〔従来の技術及び発明が解決しようとする課題〕

CPB-I はヒト胎盤をはじめとする生体内の組織及び分泌液に広く分布し (Chem. Pharma. Bull. 38, 1957~1960, 1990)、また細胞内では細胞質に存在する抗血液凝固作用等の生理活性を有する物質である。

CPB-I はヒトあるいは動物の臓器から抽出することができ (特開昭62-174023号公報)、このようにして得られたCPB-I は以下の性質を有する。

① 分子量 (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、還元状態)

34,000±2,000

② 等電点 (アンフォライトを用いる等電点カラム電気泳動法)

4.7 ± 0.1

③ 安定性

- (イ) 50℃、30分加熱処理で失活
- (ロ) pH4～10で安定
- (ハ) 血漿中37℃、30分で安定

④ 血液凝固系に対する作用

- (イ) カルシウム再加凝固時間を延長
- (ロ) プロトロンビン時間を延長
- (ハ) 活性化部分トロンボプラスチン時間を延長

⑤ アミノ酸分析

アミノ酸分析で、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、アラニン、 $\frac{1}{2}$ シスチン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、リジン及びアルギニンの存在が認められる。

また、CPB-I はヒト又は動物のCPB-I をコードする遺伝子断片を用いて、遺伝子組換え技術により大腸菌、酵母等で発現させることができる(特

開昭64-20095号公報)。このように遺伝子組換えにより得られたCPB-I (以下、これを「リコンビナントCPB-I」という)は下記のアミノ酸配列を有する。

Ala-Gln-Val-Leu-Arg-Gly-Thr-Val-Thr-Asp-Phe-Pro-Gly-Phe-Asp-Glu-Arg-Ala-Asp-Ala-Glu-Thr-Leu-Arg-Lys-Ala-Met-Lys-Gly-Leu-Gly-Thr-Asp-Glu-Glu-Ser-Ile-Leu-Thr-Leu-Leu-Thr-Ser-Arg-Ser-Asn-Ala-Gln-Arg-Gln-Glu-Ile-Ser-Ala-Ala-Phe-Lys-Thr-Leu-Phe-Gly-Arg-Asp-Leu-Leu-Asp-Asp-Leu-Lys-Ser-Glu-Leu-Thr-Gly-Lys-Phe-Glu-Lys-Leu-Ile-Val-Ala-Leu-Met-Lys-Pro-Ser-Arg-Leu-Tyr-Asp-Ala-Tyr-Glu-Leu-Lys-His-Ala-Leu-Lys-Gly-Ala-Gly-Thr-Asn-Glu-Lys-Val-Leu-Thr-Glu-Ile-Ile-Ala-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Glu-Leu-Arg-Ala-Ile-Lys-Gln-Val-Tyr-Glu-Glu-Glu-Tyr-Gly-Ser-Ser-Leu-Glu-Asp-Asp-Val-Val-Gly-Asp-Thr-Ser-Gly-Tyr-Tyr-Gln-Arg-Met-Leu-Val-Val-Leu-Leu-Gln-Ala-Asn-Arg-Asp-Pro-Asp-Ala-Gly-Ile-Asp-Glu-Ala-Gln-Val-Glu-Gln-Asp-Ala-Gln-

Ala-Leu-Phe-Gln-Ala-Gly-Glu-Leu-Lys-Trp-Gly-Thr-Asp-Glu-Glu-Lys-Phe-Ile-Thr-Ile-Phe-Gly-Thr-Arg-Ser-Val-Ser-His-Leu-Arg-Lys-Val-Phe-Asp-Lys-Tyr-Met-Thr-Ile-Ser-Gly-Phe-Gln-Ile-Glu-Glu-Thr-Ile-Asp-Arg-Glu-Thr-Ser-Gly-Asn-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Leu-Ala-Val-Val-Lys-Ser-Ile-Arg-Ser-Ile-Pro-Ala-Tyr-Leu-Ala-Glu-Thr-Leu-Tyr-Tyr-Ala-Met-Lys-Gly-Ala-Gly-Thr-Asp-Asp-His-Thr-Leu-Ile-Arg-Val-Met-Val-Ser-Arg-Ser-Glu-Ile-Asp-Leu-Phe-Asn-Ile-Arg-Lys-Glu-Phe-Arg-Lys-Asn-Phe-Ala-Thr-Ser-Leu-Tyr-Ser-Met-Ile-Lys-Gly-Asp-Thr-Ser-Gly-Asp-Tyr-Lys-Lys-Ala-Leu-Leu-Leu-Leu-Cys-Gly-Glu-Asp-Asp

また、リコンビナントCPB-I は大腸菌以外にも酵母を使用しても製造することができる。この場合、アミノ末端のアラニンにアセチル基が結合したアミノ酸配列となる。

このようなCPB-I 又はリコンビナントCPB-I は、液剤、ゲル化剤、軟膏、点眼液、注射剤等種々の剤形とすることができる。

しかしながら、製剤化の過程で分離精製・凍結乾燥等を行なう必要があり、また上記のような製剤とした後、長期保存する必要があり、このときCPB-I が重合等を起こし、その活性が低下してしまうという欠点があった。

従って、CPB-I 又はリコンビナントCPB-I の安定化方法及び安定な製剤組成物が望まれていた。

[課題を解決するための手段]

本発明者らは上記実状に鑑み鋭意研究を重ねた結果、CPB-I 又はリコンビナントCPB-I に糖類を添加すれば、これらの安定化を図ることができ、分離精製・凍結乾燥等の操作を行っても、またこれを製剤化して長期保存しても活性が低下しないことを見出し本発明を完成した。

すなわち本発明は、CPB-I 又はリコンビナントCPB-I に糖類を添加することを特徴とするCPB-I 又はリコンビナントCPB-I の安定化方法及びCPB-I 又はリコンビナントCPB-I 及び糖類を含有することを特徴とするCPB-I 又はリコンビナントCPB-I が安定化された製剤組成物に関する。

本発明で用いられる糖類としては、例えば、グルコース、グルコサミン、キシロース、サッカロース、デキストランT-40等が挙げられるが注射用製剤とする場合はグルコースが好ましい。糖類の配合量はCPB-I 又はリコンビナントCPB-I (以下、「CPB-I 等」という) を含有する溶液 1 ml あたり 0.4 ~ 20mg 程度が好ましい。なお、粉末に添加する場合の安定化剤の添加量は、当該粉末を溶解した際に、上記の溶液濃度になるようにすればよい。糖類の配合量が 0.4 mg 未満であると安定化が図り難く、20mg を超えて配合してもあまり効果の向上は望めない。

糖類の添加方法は特に限定されず、CPB-I 等の溶液に直接添加する方法、あらかじめ糖類を水又は適当な緩衝液に溶解して添加する方法、糖類の粉末をCPB-I 等と混合せしめて水等に添加・溶解する方法等、適宜選択すればよい。また、添加時期も特に限定されず、CPB-I 等の分離精製工程、製剤工程のいずれであってもよい。

CPB-I 等に糖類を添加した本発明の安定化組成

サミン塩酸塩、キシロース、サッカロース、デキストランT-40の夫々を 1 ml あたり各 5 mg 加えた溶液 100 μ l を -40℃ で凍結させ、室温で融解した。この操作を 5 回繰り返した後下記測定方法により分析を行った。結果を表 1 に示す。

HPLCによるCPB-I の重合体の測定

あらかじめ 0.14M NaCl を含む 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した東ソー社製 HPLC ゲル濾過用カラム TSK gel G3000SW_{XL} (7.8 \times 300mm) に同上緩衝液 1 mg/ml に希釈した試料溶液 20 μ l を注入した。流速 1 ml/min で重合体との分離を行い、カラムから溶出された試料の吸光度を波長 280nm で測定し、面積値より CPB-I とその重合体との割合を算出した。

以下余白

物は、溶液の場合 0 ~ 30℃、特に 0 ~ 10℃ で分離精製、製剤化又は保存することが好ましい。また、同溶液を凍結状態で保存する場合は 0℃ 以下、特に -20℃ 以下とすることが好ましい。

本発明の CPB-I 等含有安定化剤組成物は、用途に応じて種々の剤形とすることができる。例えば、抗血液凝固剤として用いる場合は、水性注射剤等の形態とし皮膚・角膜疾患治療剤として用いる場合は、液剤、ゲル、クリーム、軟膏、点眼液、眼軟膏等の形態とすることができる。

〔発明の効果〕

本発明の方法によれば、CPB-I 等を凍結・融解、水性媒体への溶解等の分離・精製、製剤化工程を経ても CPB-I 等の活性が保持される。また本発明の製剤組成物は長期保存しても CPB-I の活性低下がなく、医薬品として有用である。

〔実施例〕

実施例 1

10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した CPB-I 6.76mg/ml に安定化剤としてグルコース、グルコ

表 1

安 定 化 剤	CPB-I 重合体 (%)	CPB-I の純度 (%)
無 添 加	9.1	90.9
グルコース	0.4	99.6
グルコサミン塩酸塩	0.7	99.3
キシロース	0.4	99.6
サッカロース	0.4	99.6
デキストランT-40	0.4	99.6

実施例 2

10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した CPB-I 6.76mg/ml に安定化剤としてグルコースを 1 ml あたり 0.04 ~ 20mg 加えた溶液 100 μ l を -40℃ で凍結させた後室温で融解した。この操作を 5 回繰り返した後実施例 1 と同様にして分析を行った。結果を表 2 に示す。

以下余白

表 2

グルコース (mg/ml)	CPB-I 重合体 (%)	CPB-I の純度 (%)
20	0.3	99.7
4	0.3	99.7
2	0.3	99.7
0.4	0.8	99.2
0.2	1.9	98.1
0.04	3.5	96.5
0	3.4	96.6

実施例 3

10mMリン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解したCPB-I
6.76mg/mlに安定化剤としてグルコースを1mlあ
たり10mgを加えた溶液について下記方法により抗
血液凝固活性の測定を行った。結果を表3に示す。

抗血液凝固活性の測定

0.5%ウシ血清アルブミン及び0.15M NaClを含
む20mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) で5及び10
μg/mlに希釈した試料溶液 100μlに30mM

CaCl₂溶液で希釈した持田製薬社製リオプラスチ
ン0.5mg/mlを100μlに加え37℃で3分間ブレ
ンキュベートした。更に、37℃で生理食塩水2ml
に溶解したオーソ社製コントロール血漿 200μl
を加えエルマ光学社製コアグテックTB-600を用い
て血漿が凝固するまでの時間を測定した。

表 3

安 定 化 剤	血液凝固阻害活性 (%)
無 添 加	100.0
グルコース 10mg/ml	99.7

以上